

مطالعه فراساختاری اشکال آپوتوتیک سلولهای اسپرماتوژنیک به‌دنبال تیمار با بوسولفان در موش بالغ

فهیمة محمد قاسمی (Ph.D.)^۱، جعفر سلیمانی راد (Ph.D.)^۲، احمد علی قنبری (Ph.D.)^۳

۱- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی گیلان، رشت، ایران.

۲- آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۳- گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: شیمی‌درمانی دارای اثرات سوء بر اسپرماتوژنز است و منجر به اولیگواسپرمی و یا آزواسپرمی برای مدت‌های طولانی می‌شود. مطالعات کمی در ارتباط با تغییرات فراساختاری سلول‌های زایای مردانه به‌دنبال تجویز بوسولفان (داروی ضد سرطان) وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تغییرات فراساختاری اشکال آپوتوتیک سلول‌های زایای موش نر به‌دنبال تیمار با دوزهای مختلف بوسولفان می‌باشد.

روش بررسی: مطالعه حاضر روی ۳۲ موش نر بالغ ۸ هفته‌ای انجام گرفت. حیوانات در ۴ گروه شامل یک گروه کنترل که DMSO دریافت می‌کردند و در سه گروه مورد که به ترتیب دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg بوسولفان دریافت نمودند. بوسولفان به تک دوز و به‌صورت داخل صفاقی تزریق و پس از ۳۵ روز بیضه‌ها در همه گروه‌ها تشریح شد و جهت مطالعه آپوتوز با کمک میکروسکوپ الکترونی انتقالی TEM و روش تانل TUNEL تحت بررسی قرار گرفت. همه یافته‌ها با روش آماری ANOVA و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: تزریق بوسولفان به صورت تک دوز اشکال فراساختاری آپوتوز را در همه گروه‌ها القاء کرد. تغییراتی مانند هیپرکروم شدن کناری هسته سلول‌های زایا به‌خصوص اسپرماتوگونیا، تغییر شکل هسته سلول‌های زایا، جدا شدن سلول‌های زایا، حضور فضاهای بزرگ بین سلول‌های مجاور، چروکیدگی سلولی، حضور واکوئل در سلول‌های زایا و اجسام آپوتوتیک در سلول‌های سرتولی غالباً مشاهده شد. بیشترین تغییرات فراساختاری آپوتوز در اسپرماتوگونیا و اسپرماتوسیت‌های اولیه مشاهده گردید. شیوع کم و خودبخودی آپوتوز در گروه کنترل ($2/77 \pm 0/07$) به‌خصوص در اسپرماتوسیت‌های اولیه مشاهده شد. درصد سلول‌های آپوتوتیک در مقاطع عرضی لوله‌های سمینیفروس در گروه‌های تحت درمان با ۱۰ و ۲۰ mg/kg بوسولفان، به ترتیب ($54/09 \pm 6/23$) و ($58/23 \pm 7/22$) به‌صورت معنی‌دار افزایش یافت. درصد سلول‌های آپوتوتیک در گروه تحت درمان با ۴۰ mg/kg بوسولفان، ($28/16 \pm 5/67$) نیز افزایش داشت ($p < 0/001$).

نتیجه‌گیری: تزریق تک دوز بوسولفان در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg/kg آپوتوز را در سلول‌های زایای نر به‌خصوص در اسپرماتوگونیا و اسپرماتوسیت‌های اولیه القاء می‌کند. مقدار آپوتوز در سلول‌های زایای نر در گروه‌های تحت درمان با بوسولفان، وابسته به دوز نمی‌باشد. کاهش در مقدار سلول‌های آپوتوتیک در گروه تحت درمان با ۴۰ mg/kg بوسولفان، ممکن است ناشی از کاهش بیشتر تعداد سلول‌های زایا در مقایسه با گروه‌های تحت درمان با ۱۰ و ۲۰ mg/kg باشد.

کلید واژگان: بوسولفان، شیمی‌درمانی، سلول زایا، آپوتوز، اسپرماتوژنز، آزواسپرمی، سلول سرتولی، بیضه.

مسئول مکاتبه: دکتر فهیمة محمد قاسمی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، مجتمع دانشگاهی گیلان، کیلومتر ده جاده تهران-رشت، رشت، ایران.

پست الکترونیک: parsahistolab@gmail.com

زمینه و هدف

آپوپتوز عبارتست از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده که به‌صورت طبیعی در مراحل مختلف مرفوژنز هم در بافت‌های جنینی و هم در دوره بزرگسالی رخ می‌دهد. مانند سایر بافت‌ها، آپوپتوز در سلول‌های زایای بیضه در طول مراحل زندگی و اسپرماتوژنز نیز رخ می‌دهد (۱،۲). در برخی شرایط پاتولوژیک مانند تغییرات ژنتیکی مثل خانواده BCL₂ و لیگاند Fas و p53 (۳) گرما (۳) قرار گرفتن در معرض تشعشعات یونیزان (۴) مواد سمی و محرومیت‌های هورمونی و فاکتورهای رشد (۱،۵،۶) نهان بیضگی (۳) و موتاسیون ژن‌های c-kit/sef (۵) میزان بروز آپوپتوز در سلول‌های زایای بیضه افزایش می‌یابد.

سلولی که فرایند آپوپتوز را طی می‌کند از نظر مورفولوژی گرد و چروکیده می‌شود و کروماتین متراکم می‌گردد و غشاء هسته به‌تدریج پیوستگی خود را از دست می‌دهد و به دلیل تجزیه شدن DNA، هسته به چندین قطعه یا کروماتین بادی شکسته می‌شود. سپس سلول به چندین وزیکول تحت عنوان اجسام آپوپتوتیک شکسته می‌شود که در نهایت بوسیله سلول‌های فاگوسیتوزکننده و یا سرتولی فاگوسیتوز می‌شوند (۱،۲،۷). داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های زایای بیضه القاء نماید. بوسولفان یکی از عوامل شیمی‌درمانی از دسته ترکیبات الکیله‌کننده DNA است و در بررسی درمان لوسمی میلوژنیک مزمن، سرطان تخمدان و همچنین در بیماران که تحت عمل پیوند مغز استخوان قرار می‌گیرند جهت تخلیه مغز استخوان استفاده می‌شود (۸،۹). بوسولفان به دلیل خاصیت الکیله‌کنندگی DNA دارای تأثیر سوء بر سلول‌هایی است که دارای قدرت تقسیم بیشتری هستند؛ به همین دلیل بیشترین اثر خود را روی اسپرماتوگونیا می‌گذارند (۱۰،۱۱). با وجود این، تمام اسپرماتوگونیا به‌دنبال بوسولفان از بین نمی‌روند (۱۰). همچنین

مصرف بوسولفان باعث آنومالی کروموزومی اسپرم و موتاسیون‌های کشنده غالب در اسپرم می‌شود (۱۲) مصرف دارو در خانم‌های باردار منجر به ایجاد اختلال در عملکرد گنادها و کاهش سلول‌های سوماتیک و زایای بیضه در نوزادان می‌شود (۱۳،۱۴). در بررسی‌های انجام شده در انسان، درمان ترکیبی بوسولفان همراه با سیکلوفسفامید باعث کاهش فعالیت گنادها و اختلالات آندوکروینی می‌شود (۱۵،۱۶).

استفاده از بوسولفان به خصوص در سال‌های اخیر به‌طور عمده جهت القاء آزواسپرمی قبل از پیوند سلول‌های زایا به داخل بیضه در گونه‌های مختلف حیوانی صورت گرفته است (۱۷،۱۸). بر اساس مطالعات Boujrad در سال ۱۹۹۵ و Howel در ۲۰۰۱ درمان با بوسولفان و سیکلوفسفامید مقادیر گنادوتروپین‌های LH و FSH را افزایش می‌دهد (۱۹،۲۰).

علیرغم اینکه مطالعات متعددی از نظر هیستوپاتو-لوژیکی در ارتباط با بوسولفان انجام شده است، ولی مطالعات کمی در ارتباط با مکانیسم اثر بوسولفان بر تخریب سلول‌های زایا وجود دارد. به نظر می‌رسد یکی از راه‌هایی که بوسولفان باعث تخریب سلول‌های زایا می‌شود، القاء آپوپتوز است و تنها مطالعه موجود در این زمینه مطالعه Choi و همکاران در سال ۲۰۰۴ است که نشان داد بوسولفان در دوز 40 mg/kg می‌تواند اثرات آپوپتوز را در بیضه موش القاء نماید (۹). Choi در مطالعه خود اثر تک دوز بالای بوسولفان یعنی 40 mg/kg را در زمان‌های مختلف بر بیضه ارزیابی نمود. هرچند Choi در مطالعه خود ارزیابی فراساختاری سلول‌های زایا را انجام نداد.

میکروسکوپ الکترونی انتقالی^۱ یکی دیگر از ابزارهایی است که جهت تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک می‌تواند به کار رود و به نظر می‌رسد که در بین روش‌های مورفولوژیک تشخیص آپوپتوز با میکروسکوپ

1- Transmission

بافر ۱۰٪ ثابت شدند. طی روند درمان دو حیوان در گروه تحت درمان با 40 mg/kg از بین رفتند و از مطالعات آماری حذف گردیدند.

پاساژ بافتی میکروسکوپ الکترونی: نمونه‌ها در فیکساتیو اولیه در طول شب در دمای 4°C انکوبه شدند. سپس با فسفات بافر 0.2 M ($\text{pH}=7.4$) شستشو صورت گرفت. جهت ثبوت ثانویه بافت، از اسمیوم تتراکسید ۲٪ (TAAB, UK) به مدت دو ساعت استفاده و پس از شستشو، مراحل دهیدراسیون بافتی با استفاده از الکل با درجات صعودی انجام و از اپوکسی رزین (Araldite, Australia) جهت قالبگیری استفاده شد. پس از قالبگیری، پلیمریزاسیون در ۲ مرحله انجام گردید. ابتدا قالب‌های حاوی نمونه برای مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای 40°C و سپس در آون 60°C برای ۴۸ ساعت دیگر انکوبه گردید. جهت برش بافتی از اولترامیکروتوم (Reichert-Jung Austria) استفاده شد. ابتدا برش‌های نیمه نازک 500 nm و پس از آن با استفاده از تیغه الماس برش‌های نازک 100 نانومتری تهیه شد. جهت رنگ‌آمیزی از اورانیل استات و سیترات سرب استفاده گردید، سپس گریدها با TEM مدل ۹۰۶ (Leo, Germany) با ولتاژ 100 kV ، مورد ارزیابی قرار گرفتند و از قسمت‌های مورد نظر عکس‌برداری شد.

مطالعه ایمونوهیستوشیمی: پس از ثبوت بافتی در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت، مراحل پاساژ بافتی ادامه یافت. سپس نمونه‌ها در پارافین قالبگیری شده و پس از آن با استفاده از میکروتوم دوار (Leitz, Germany) برش‌های $3\text{ }\mu\text{m}$ تهیه و به‌منظور برداشت پارافین اضافی بافت، دو بار از گزین به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. پس از آن مراحل دهیدراسیون در الکل با درجات نزولی انجام گردید. پس از شستشو در PBS و خشک شدن لامها، ارزیابی TUNEL آغاز شد. جهت انجام آزمایش تانل از کیت تشخیصی (Roche, Germany) استفاده گردید. ابتدا به منظور جلوگیری از

الکترونی به‌عنوان استاندارد و مرجع باشد زیرا که می‌تواند اجسام آپوپتوتیک را در مراحل مختلف پیشرفت آپوپتوز در سلولها نشان دهد (۷). هدف از این مطالعه بررسی تغییرات فراساختاری و همچنین آپوپتوتیک سلول‌های زایا به‌دنبال مصرف دوزهای مختلف بوسولفان (40 mg/kg و 20 و 10) در بیضه موش‌های بالغ بود.

روش بررسی

در این مطالعه از ۳۲ موش نر بالغ ۸ هفته نژاد NMRI استفاده گردید. حیوانات از موسسه رازی (کرج- ایران) خریداری و جهت تطابق با محیط ۲ هفته در قفس‌های خود با دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند. پس از آن حیوانات به ۴ گروه (هر گروه ۸ سر موش) تقسیم شدند. به موش‌های گروه کنترل 0.5 ml DMSO ۲٪ (Sigma, USA) به صورت درون صفاقی تزریق شد؛ در حالیکه به موش‌های گروه‌های دوم، سوم، چهارم به ترتیب دوز 40 mg/kg و 20 و 10 بوسولفان (Sigma, USA) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. به‌منظور حل شدن بوسولفان از DMSO و آب مقطر با حجم یکسان استفاده گردید (۲۲،۲۱).

با توجه به اینکه سیکل کامل اسپرماتوزن در موش ۳۵ روز طول می‌کشد؛ لذا پنج هفته پس از درمان، همه حیوانات کشته شدند و بیضه آنها جهت مطالعه میکروسکوپ الکترونی و ایمونوهیستوشیمی از بدن خارج گردید. بدین ترتیب که بیضه چپ جهت مطالعه میکروسکوپ الکترونی و بیضه راست جهت مطالعه میکروسکوپ نوری مورد استفاده قرار گرفت. جهت ثبوت اولیه بافت برای میکروسکوپ الکترونی، از محلول ترکیبی گلوآل‌آلدئید ۲/۵٪ (ProSciTech, Australia) و پارافرمال‌آلدئید ۴٪ (Merck, Germany) استفاده شد و جهت مطالعه ایمونوهیستوشیمی، نمونه‌ها در فرمالین

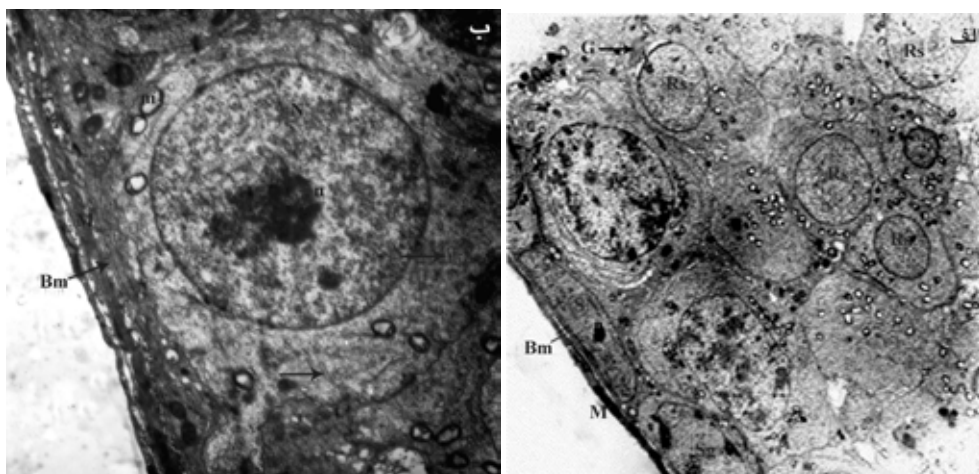
بیان و مقادیر $p \leq 0/05$ معنی‌دار تلقی شد. جهت ارزیابی تفاوت معنی‌دار بین گروهها از تست توکی استفاده شد.

نتایج

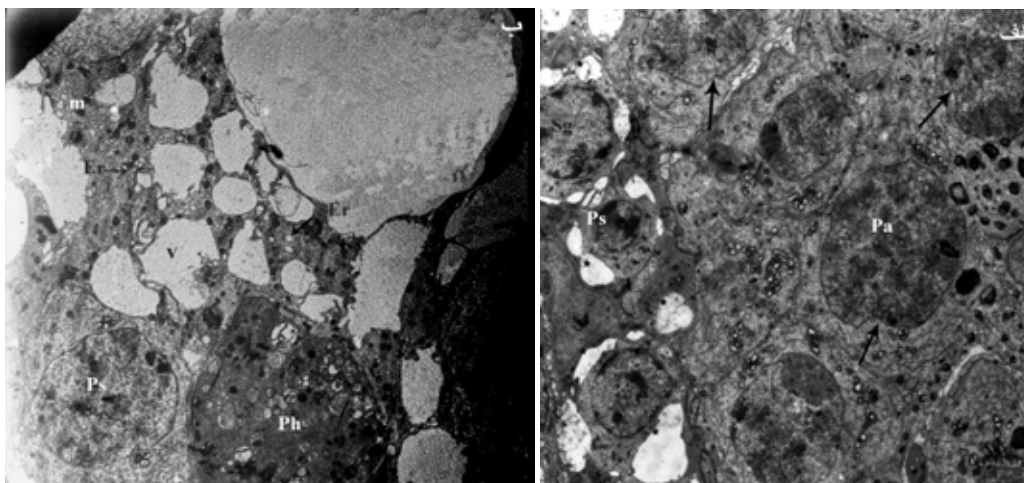
در گروه کنترل اسپرmatوگونیا روی غشای پایه تکیه داشتند و دارای هسته گرد تا بیضوی شکل و یوکروماتین بودند و همچنین دارای هستک مرکزی و اندکی هترو کروماتین کناری بودند و در مقایسه با سیتوپلاسم ساین هسته بزرگتر بود. ریبوزمها و دستجات شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی در سیتوپلاسم قابل رویت بود. از مشخصات دیگر آنها میتوکندری‌های تیره به تعداد کم بود (شکل ۱- الف). اسپرmatوسیت‌های اولیه با اندازه بزرگتر و محل قرارگیری آنها قابل تشخیص بود که هسته گرد آنها در مراحل مختلف میوز قابل مشاهده بود. اغلب اسپرmatوسیت‌های اولیه بالاتر از اسپرmatوگونیاها و نزدیک‌تر به لومن قرار داشتند، مگر اسپرmatوسیت‌های اولیه مرحله لپتوتن یا پره لپتوتن که آنها نیز در کنار اسپرmatوگونیاها و بر روی غشاء پایه تکیه داشتند و به‌طور کلی آنها دارای شبکه آندوپلاسمی نسبتاً توسعه یافته و همچنین دستگاه گلژی در سیتوپلاسم خود بودند

بروز واکنش محلول تائل با پروتئین‌های آندوژن، از پراکسید هیدروژن (Merck, Germany) $0/3\%$ در متانول استفاده شد. در مرحله بعد بافت با پروتئیناز K (Roche, Germany) به مدت نیم ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شد. پس از شستشو با PBS، $50\ \mu\text{l}$ مخلوط تائل به مدت نیم ساعت به بافت اضافه گردید. در مراحل بعدی، نمونه با POD (Roche, Germany) و سپس با سوپسترای (Roche, Germany) DAB (انکوبه شد. جهت رنگ‌آمیزی زمینه از تولوئیدین بلو استفاده شد. سپس اسلایدها با میکروسکوپ نوری (Ziess, Germany) مطالعه شدند که سلول‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای و سایر سلول‌های غیر آپوپتوتیک رنگ‌آمیزی زمینه (آبی) را نشان دادند. با استفاده از میکروسکوپ نوری، تعداد سلول‌های قهوه‌ای در $40\times$ مقطع عرضی لوله منی‌ساز در هر حیوان شمارش و بر تعداد کل سلول‌های موجود در هر لوله (آپوپتوتیک و غیرآپوپتوتیک) تقسیم و در نهایت به‌صورت درصد بیان شد (۲۳).

آنالیزهای آماری: به منظور مقایسه آماری، یافته‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یکطرفه تحلیل شدند. یافته‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار



شکل ۱- الف: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش کنترل. هسته سلول سرتولی (SN)، سلول میوئید (M)، غشاء پایه (Bm)، اسپرmatوگونی (Sg)، اسپرmatوسیت اولیه (Ps)، اسپرmatید گرد (RS)، آکروزوم در حال تکامل (A)، دستگاه گلژی (G). بزرگنمایی $2100\times$ ؛ ب: فوتومیکروگراف الکترونی از اسپرmatوسیت اولیه مرحله پره‌لپتوتن در موش کنترل. به هسته گرد و منظم (N)، هستک (n)، میتوکندری روشن (m)، و پروفایلهای شبکه آندوپلاسمی نسبتاً توسعه یافته (پیکان)، و حضور سلول بر روی غشاء پایه (Bm) منظم و هسته سلول میوئید (M) توجه نمایند. بزرگنمایی $2750\times$.



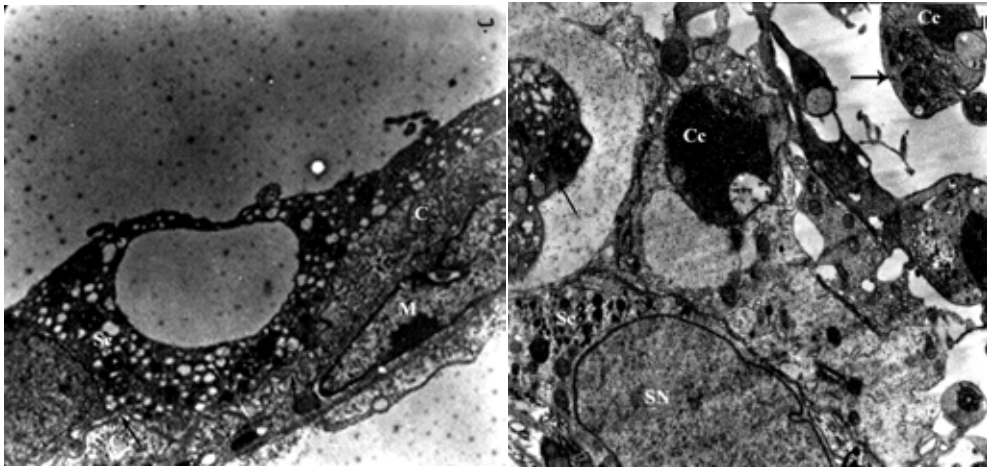
شکل ۲- الف: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش تحت درمان با 10 mg/kg بوسولفان. اسپرماتوگونی (Sg) اسپرماتوسیت اولیه (Ps)، پیکانها دفرمه شدن هسته را نشان می‌دهند و ستاره‌ها (*) نیز فضای بین سلولها را نشان می‌دهند. بزرگنمایی $\times 2100$. ب: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش تحت درمان با 10 mg/kg بوسولفان. اسپرماتوسیت اولیه (Ps)، به حضور واکوئل‌های بزرگ و زیاد (V) و فاگوزوم (Ph)، شبکه آندوپلاسمی (Er)، میتوکندری (m) در داخل سیتوپلاسم سلول سرتولی توجه شود. بزرگنمایی $\times 2704$.

اولیه بودند و در مقایسه با آنها به لومن نزدیکتر و اغلب آنها گرد بودند ولی در اغلب موارد بدلیل نزدیکی به یکدیگر حالت چندوجهی به خود می‌گرفتند. این سلولها دارای هسته گرد بزرگ و نوکلئوپلاسم یکنواخت و یوکرماتین بودند. همچنین سیتوپلاسم وسیع آنها حاوی میتوکندری‌های کوتاه با فضای داخلی نسبتاً گشاد و تعداد زیادی ریبوزوم و پروفایل‌های لوله‌ای شکل شبکه آندوپلاسمی و یا دستگاه گلژی کاملاً تکامل یافته در

و در مقایسه با اسپرماتوگونیها، دارای تعداد بیشتری میتوکندری روشن بودند (شکل ۱-ب). غشاء پایه به صورت کاملاً منظم در دو لایه تیره و روشن مشهود بود و در خارج از غشاء پایه سلول‌های کشیده میوئید با هسته بزرگ یوکروماتین و هتروکروماتین کناری پراکنده دیده می‌شدند. در هر طرف سلول‌های میوئید، رشته‌های کلاژن قابل رویت بودند (شکل ۱-الف و ب). اسپرماتیدهای جوان گرد کوچکتر از اسپرماتوسیت‌های



شکل ۳- الف: فوتومیکروگراف الکترونی از سلول اسپرماتوگونی در موش تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان. به کروماتین کناری هتروکروماتین نعل اسبی شکل (پیکان توپر) توجه نمایید. پیکانهای باریکتر موج بودن غشاء پایه را نشان می‌دهند. به افزایش ضخامت غشاء پایه و همچنین سلول میوئید (M) توجه نمایید. بزرگنمایی $\times 2750$. ب: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان. هسته سلول سرتولی (SN)، هستک (n)، پیکانها سلول‌های آپوپتوتیک در مراحل پیشرفته که با متراکم شدن کروماتین و ناپدید شدن اجزاء سیتوپلاسم و چروکیدگی سلولها، مشخص می‌شوند را نشان می‌دهند. بزرگنمایی $\times 2700$. ج: فوتومیکروگراف الکترونی از سیتوپلاسم سلول سرتولی در موش تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان. به حضور واکوئل‌های بزرگ (*) دقت نمایید. پیکان یک جسم آپوپتوتیک راکه توسط سلول سرتولی در بر گرفته شده است، نشان می‌دهد. بزرگنمایی $\times 1000$.



شکل ۴- الف: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش تحت درمان با 40 mg/kg بوسولفان. هسته سلول سرتولی (SN)، سیتوپلاسم سلول سرتولی (Sc)، به حضور سلول‌های آپوپتوتیک در داخل لومن لوله منی‌ساز با کروماتین متراکم (Cc)، واکوئل‌های داخل سلولی (*) و تجمع ارگانها در یک نقطه مقابل هسته (پیکان)، توجه نمایید. بزرگنمایی ۶۰۰۰×، ب: فوتومیکروگراف الکترونی از اپیتلیوم ژرمینال در موش تحت درمان با 40 mg/kg بوسولفان. سیتوپلاسم سلول سرتولی (Sc)، پیکانها موج بودن غشاء پایه را نشان می‌دهند. به ضخیم شدن و افزایش میزان کلاژن (c) موجود در غشاء پایه و همچنین به هسته دنداندار سلول میوبید (M) توجه نمایید. بزرگنمایی ۴۶۶×.

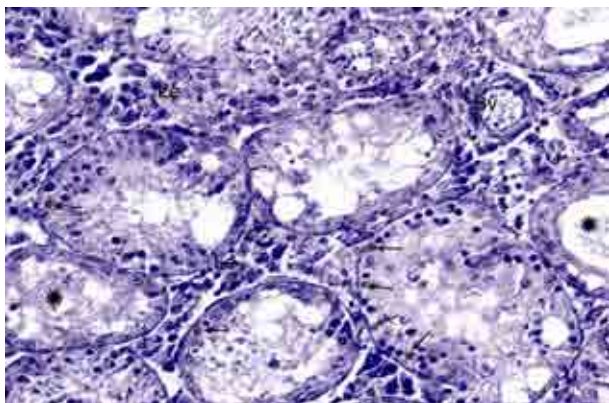
حاوی ارگانل مشاهده می‌شود. چندین واکوئل و تعداد زیادی میتوکندری تیره و کوتاه نیز در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی مشاهده می‌شود (شکل ۲- الف و ب). هرچند که اسپرماتوگونی‌های مجاور نسبتاً از هم جدا شده است ولی سلول‌های سرتولی در تماس نزدیک با یکدیگر قرار دادند. از دیگر علائم آپوپتوز، هسته هیپرکروم کناری سلول‌های زایا به ویژه سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه است (شکل ۳- الف).

در گروه تحت درمان با 20 mg/kg بوسولفان علاوه بر اینکه ضخامت اپی‌تلیوم کمتر به نظر می‌رسد تعداد بیشتری سلول‌های دژنره شده نیز در ضخامت اپی‌تلیوم به صورت هسته کاملاً متراکم، سیتوپلاسم دژنره شده و متراکم وجود داشت و در برخی موارد هسته به چند قطعه تقسیم شده بود و در کل اندازه سلول بدلیل چروکیدگی، به‌طور واضح کاهش یافته است (شکل ۳- ب). در سیتوپلاسم برخی از سلول‌های سرتولی اجسام آپوپتوتیک نیز مشاهده می‌شود (شکل ۳- ج).

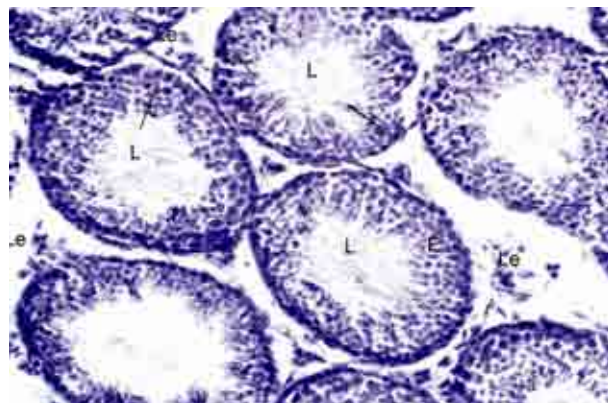
مجاورت هسته بودند (شکل ۱- الف). اسپرماتیدها در مراحل مختلف اسپرمیوژنز قابل رویت بودند بهمین دلیل شکل هسته و اکرزوم در مراحل مختلف تکامل بود و در نهایت اسپرماتیدهای دراز شده با هسته کاملاً کشیده و متراکم خود که بر روی آن اکرزوم کشیده شده بود و با فلاژل مخصوص خود که ناحیه لومن لوله را پر می‌کرد دیده می‌شدند.

در گروه تحت درمان با بوسولفان به ویژه در گروه تحت درمان با دوز 40 mg/kg سلول‌های اپی‌تلیوم ژرمینال از بین رفته بودند.

در گروه دوم که با 10 mg/kg درمان شده بودند سلول‌های اسپرماتوگونی برروی غشاء پایه قرار داشتند و دارای هسته هیپرکروم در مقایسه با کنترل بودند ضمن اینکه فضاهائی بین آنها و سلول‌های مجاورشان وجود داشت. در داخل اپی‌تلیوم ژرمینال واکوئل‌هایی دیده می‌شد که اغلب حاصل از بین رفتن سلول‌های ژرمینال است. سایر سلول‌های زایای دیگر نیز دارای هسته تغییر شکل یافته و کم رنگ در مقایسه با کنترل بودند که می‌تواند از علائم اولیه آپوپتوز باشد. در داخل سیتوپلاسم سلول سرتولی فاگوسیت‌های



شکل ۶- فوتومیکروگراف میکروسکوپ نوری از بافت بیضه در موش تحت درمان با 40 mg/kg بوسولفان. پیکانها نمایانگر سلول‌های زایای آپوتوتیک قهوه‌ای رنگ می‌باشند. برخی لوله‌ها (*) که با علامت ستاره مشخص شده‌اند تقریباً فاقد سلول زایا هستند و تنها هسته سلول‌های سرتولی در آنها دیده می‌شود. در بافت بینابینی به سلول‌های لیدیک (le) و عروق خونی (BV) توجه نمایید. رنگ آمیزی تانل رنگ زمینه تولوئیدین بلو، بزرگنمایی $\times 200$.



شکل ۵- فوتومیکروگراف میکروسکوپ نوری از بافت بیضه در موش کنترل. به تعداد کم سلول‌های زایای آپوتوتیک قهوه‌ای رنگ که با پیکان مشخص شده‌اند توجه‌نمائید. در بافت بینابینی به سلول‌های لیدیک (le) توجه‌نمایید. رنگ آمیزی تانل، رنگ زمینه تولوئیدین بلو، بزرگنمایی $\times 200$.

سلول‌های دارای تست مثبت به رنگ قهوه‌ای و به‌صورت پراکنده بودند. در برخی لوله‌ها هیچ گونه سلول مثبت مشاهده نمی‌شد. تمام سلول‌های قهوه‌ای جزء سلول‌های زایا بودند و هیچ یک از سلول‌های سرتولی یا لیدیک و میوئید به صورت مثبت رنگ نگرفتند. به‌عبارت دیگر این حالت نشان می‌داد که سلول‌های زایا دچار فرایند آپپتوز در طی اسپرماتوزنز نرمال می‌شوند. آپپتوز سلول‌های زایا در گروه کنترل بسیار کم بود و عمدتاً سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه را در بر می‌گرفت. سلول‌های دیگر بندرت دارای نتایج مثبت TUNEL بودند (شکل ۵).

درصد سلول‌های آپپتوتیک در تمامی گروه‌های آزمایش، به‌صورت معنی‌دار در مقایسه با کنترل افزایش داشت ($p \leq 0.001$)، (جدول ۱). نکته قابل توجه اینکه هرچند که علائم مورفولوژیک تخریب اسپرماتوزنز در گروه تحت درمان با 40 mg/kg بوسولفان شدیدتر به نظر می‌رسید ولی درصد سلول‌های زایای آپپتوتیک در مقایسه با گروه‌های

در گروه تحت درمان با 40 mg/kg در برخی لوله‌ها به طور کلی سلول‌های زایا از بین رفته بودند و فقط هسته‌های غول پیکر سرتولی و تعدادی هسته اسپرماتوگونی بسیار پراکنده به چشم می‌خورد. اغلب اسپرماتوگونیها علائم آپپتوتیک را از خود نشان می‌دادند هرچند که تعدادی از آنها نیز بدون علائم دژنره شدن در لوله منی ساز مشاهده می‌شدند. ضمن این که تعدادی سلول دژنره نیز در داخل لومن لوله سمینیفروس دیده می‌شد و در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی نیز کمتر فاگوزوم و یا اجسام آپپتوتیک دیده می‌شود (شکل ۴- الف) و در آن دسته از لوله‌هایی که فقط سلول سرتولی وجود دارد اتصالات محکم بین سلول‌های سرتولی به وضوح دیده می‌شود و سیتوپلاسم سرتولی به‌صورت وسیعی در تمام لوله‌ها پخش شده است؛ ضمن اینکه غشاء پایه کاملاً به‌صورت موج دیده بوده و در مقایسه با کنترل ضخیم‌تر به نظر می‌رسید. سلول‌های میوئید نیز به نظر کوتاه‌تر می‌رسیدند و سطح برخی از آنها بر خلاف گروه کنترل که صاف بود، به‌صورت دندان‌دار مشاهده می‌شدند (شکل ۴- ب).

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی با روش TUNEL در ارزیابی میکروسکوپی نوری در گروه کنترل، تعداد

جدول ۱- درصد سلول‌های آپپتوتیک در لوله‌های منی‌ساز موش بالغ بدنبال درمان با بوسولفان

شاخص مطالعه	گروه‌های آزمایشی (M±SD)			
	۴۰ mg/kg	۲۰ mg/kg	۱۰ mg/kg	کنترل
درصد سلول‌های آپپتوتیک	$28/16 \pm 0/67$	$04/09 \pm 1/23$	$05/23 \pm 7/2$	$2/77 \pm 0/07$

* $p < 0.05$

تحت درمان با 20 mg/kg و 10 بوسولفان کمتر بود ($p \leq 0.01$). در گروه‌های آزمایشی نیز فقط سلول‌های زایا به صورت آپوپتوتیک مشاهده می‌شدند.

بحث

در این مطالعه از بوسولفان به عنوان یکی از داروهای گروه آلکیل‌کننده DNA استفاده شد که در برخی بیماران مبتلا به سرطان خون و قبل از پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مطالعه نشان داد که بوسولفان در دوزهای 40 mg/kg و 20 و 10 باعث از بین رفتن سلول‌های اسپرماتوگونی در موش می‌شود؛ هرچند حتی در دوز بالا باعث از بین رفتن تمام آنها نمی‌شود. احتمالاً باقی ماندن اسپرماتوگونیا حتی در دوزهای زیاد می‌تواند دلیلی بر این مورد باشد که این سلولها می‌توانند پس از مدتی با تقسیم خود سلول‌های زایایی را در لوله منی‌ساز ایجاد نمایند. در موشها به دنبال تجویز بوسولفان سلول‌های اسپرماتوگونی باقیمانده می‌توانند مجموعه‌ای از سلولها را تشکیل دهند ولی نمی‌توانند به سلول‌های دیگر تمایز یابند (۱۰).

مشاهده واکوئل‌هایی در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال می‌تواند حاصل از بین رفتن سلول‌های زایا باشند. درمان با سیس پلاتین (۲۴) و درمان با اشعه (۲۵) به طور مشابهی می‌توانند باعث ایجاد واکوئل در ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال شوند.

این مطالعه نشان داد که در گروه تحت درمان با 10 mg/kg بین سلول‌های اسپرماتوگونی و سرتولی فضاهائی به وجود می‌آید که نشان‌دهنده از دست دادن اتصالات سلولی است که به عنوان یکی از علائم پره‌آپوپتوز مطرح است. در ارتباط با این زمینه آزمایشات *In Vitro* نشان داده‌اند که اتصال بین سلول‌های سرتولی- زایا باعث افزایش بقاء سلول زایا

می‌شود و پروتئین‌های خارجی سلولی بافت همبند^۱ نقش مهمی در برقراری اتصالات بین سلول سرتولی و زایا دارند (۲۶، ۲۷). در گروه 10 mg/kg علاوه بر ایجاد فضا بین سلول‌های اسپرماتوگونی، هسته اسپرماتوگونی‌های پر رنگ‌تر ضمن این که هتروکروماتین کناری نیز بیشتر بود و این علامت در گروه‌های آزمایشی دیگر نیز به میزان بیشتر مشاهده می‌شد. این علامت می‌تواند به عنوان مرحله اولیه آپوپتوز اسپرماتوگونی مطرح باشد و مطالعه حاضر با مطالعات Allan در سال ۱۹۹۸ و Ateeq در سال ۲۰۰۶ هماهنگی دارد (۲۹، ۲۸). تغییر شکل هسته سایر سلول‌های زایا به ویژه اسپرماتوسیتها می‌تواند ناشی از تغییراتی در اسکلت هسته باشد. در تائید این یافته کلیه تغییرات در پروتئین‌های اسکلت سلولی و تجزیه لامیناهای هسته نیز به عنوان یکی از عوامل القاء کننده آبشار آپوپتوز مطرح می‌باشد (۳۰).

با افزایش دوز بوسولفان یعنی در دوزهای 40 mg/kg و 20 تراکم شدید هسته و سیتوپلاسم و وجود واکوئل داخل سیتوپلاسم به چشم می‌خورد که این علائم نیز به عنوان درجات پیشرفته‌تر آپوپتوز مطرح است (۲۹، ۲۸). همچنین در گروه 40 mg/kg ، تعداد نسبتاً زیادی از سلولها دارای هسته کاملاً متراکم و نعل اسبی شکل و دارای واکوئل بودند؛ ضمن اینکه ارگانل‌های سلولی در نقطه مقابل هسته به چشم می‌خورد و براساس مطالعات Allan نیز می‌تواند به عنوان مرحله پیشرفته آپوپتوز مطرح شود (۲۸). همچنین وجود اجسام آپوپتوتیک در داخل سیتوپلاسم سرتولی نیز می‌تواند از علائم آپوپتوز باشد که به طور مشابهی Print و Francavilla نیز این اجسام را در داخل سرتولی گزارش نموده‌اند (۳۲، ۳۱). در این مطالعه به نظر می‌رسید که در گروه 40 mg/kg میزان فاگوزومها و اجسام آپوپتوتیک داخل سرتولی کمتر از گروه‌های آزمایش دیگر باشد. ضمن این که در گروه چهارم

1- Co-adherents

تعدادی از سلول‌های زایایی که دچار تغییرات تخریبی شده بودند به جای آنکه در داخل سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی دیده شوند در داخل لومن مشاهده می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که بوسولفان دارای تأثیر سوء روی کارکرد سلول سرتولی بود و احتمالاً به دلیل عدم عملکرد مناسب، این سلولها نمی‌توانند سلول‌های زایای آپوپتوتیک را به خوبی تشخیص داده و فاگوسیت نمایند (۳۳،۳۴) در رت‌ها رشته‌های ویمنتین^۱ موجود در سلول‌های سرتولی نقش مهمی در نگهداری اسپرماتوژنز و سلول‌های لوله سمی نیفرس دارند و هرگونه تغییر در بیان پروتئین ویمنتین با اختلالات و تخریب اسپرماتوژنز همراه است. به همین ترتیب Kopecky در سال ۲۰۰۵ نشان داد بوسولفان که باعث تخریب اسپرماتوژنز می‌شود با تغییراتی در سلول سرتولی و بیان ویمنتین همراه است. به عبارت دیگر بوسولفان نه تنها دارای اثرات سوء بر سلول‌های زایا است بلکه سلول‌های سرتولی را نیز تغییر می‌دهد (۳۵). نشاندار کردن DNA قطعه قطعه شده که با استفاده از روش TUNEL نیز نتایج میکروسکوپ الکترونی را تأیید نمود. این یافته نشان داد که درمان با بوسولفان در هر سه دوز 10 mg/kg و 20 و 40 می‌تواند باعث افزایش القاء آپوپتوز سلول‌های زایای پره‌میوز و میوتیک گردد که ممکن است روشی جهت جلوگیری از انتقال آنومالیها به حساب آید (۳۶،۳۷). این مطالعه در راستای مطالعه Choi در سال ۲۰۰۴ بود که اثر آپوپتوتیک بوسولفان در دوز 40 mg/kg را در موشها در یک وضعیت وابسته به زمان انجام داد ضمن این که دوز (40 mg/kg) در موشها دوز بالائی است و می‌تواند با مرگ و میر نیز همراه باشد (۹). در حالیکه در این مطالعه علاوه بر دوز 40 mg/kg از دوزهای 20 و 10 mg/kg نیز استفاده شد و در این دوزهای کمتر بوسولفان نیز اثر آپوپتوتیک مشاهده گردید. به طور مشابهی درمان با سیس پلاتین

(۲۴،۳۸) و سیکلو فسفاماید (۳۹)، دوکسوروبی سین (۷) و همچنین اشعه‌درمانی (۷) نیز باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های زایا می‌شود. در مطالعه اخیر دوز 40 mg/kg نتوانست منجر به افزایش تعداد سلول‌های با تست TUNEL مثبت در مقایسه با دوزهای کمتر شود. احتمالاً این عامل می‌تواند ناشی از کاهش بیشتر سلول‌های زایای موجود در لوله منی‌ساز و در نتیجه کاهش سلول‌های دارای مثبت TUNEL باشد که این رابطه در مطالعه قبلی محققین با کمک روش‌های مورفومتريک و شمارش سلول‌های زایا نشان داده شد که در دوز 40 mg/kg ، تعداد سلولها به میزان بیشتری کاهش می‌یابد و به عبارت دیگر در این دوز، تقریباً تمام لوله‌ها فاقد اسپرماتوگونی و اسپرم می‌گردند (۲۱). یافته مشابهی به دنبال درمان با دوزهای بالای سیس پلاتین گزارش شده است (۳۷) که احتمالاً حاصل از دست دادن بیشتر قطعات DNA در دوزهای بالاتر است (۳۷،۴۰). در این مطالعه عمده سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه مشخصات آپوپتوز را نشان دادند. با توجه به این که عوامل آلکیله به‌طور عمده روی سلول‌های با قدرت تقسیم بالا تأثیر می‌گذرانند، سلول‌های اسپرماتوژنیک به‌خصوص اسپرماتوگونی هدف مهمی برای بوسولفان و عوامل مشابه می‌باشد (۹،۴۱،۴۰). همچنین انواع مختلف سلول‌های زایا تفاوت‌های قابل توجهی در پاسخ به تحریکات استرس‌زای منجر به بروز آپوپتوز دارند (۲،۳۲). برای نمونه مارکرهای Pad51 و MAK در اسپرماتوسیتها در حالیکه مارکرهای TGF β , L در اسپرماتیدهای گرد بیان می‌شوند (۹). Choi نشان داد که به دنبال درمان با بوسولفان مارکرهای MAK و Pad51 که در ترمیم DNA نقش دارند کاهش می‌یابند و بنابراین تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه‌ای که متحمل آپوپتوز می‌شوند زیاد می‌باشد (۹). به عبارت دیگر سلول‌های مختلف در یک بافت حتی در برخورد با یک ماده با دوز مشابه، از

1- Vimentin

القاء بیشتر آپوپتوز در سلول‌های زایا نمی‌شود. به‌هرحال به توجه به اینکه مکانیسم‌های دقیق شیمی‌درمانی که منجر به آپوپتوز می‌شود به طور کاملاً واضح شناخته نشده است به‌همین جهت مطالعات بیشتری به‌ویژه در سطح مولکولی مورد نیاز می‌باشد.

تشکر و قدردانی

با سپاس از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه‌های انجام این تحقیق را تأمین نمودند. همچنین از سرکار خانم آیدا اعظمی، کارشناس آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی، جهت همکاری صمیمانه در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

نظر بروز آپوپتوز پاسخ یکسانی نمی‌دهند و شاید به همین دلیل در مطالعه حاضر نیز همه سلول‌های اسپرماتوژنیک پاسخ مشابهی در برابر بوسولفان بروز ندادند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی مطالعات میکروسکوپ الکترونی و ایمونوهیستوشیمی نشان داد که یکی از مکانیسم‌های اثرات تخریبی بوسولفان بر روند اسپرماتوژنز، آپوپتوز است. بوسولفان در هر سه دوز 40 mg/kg و 20 و 10 می‌تواند باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های زایا، به‌ویژه سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه شود. درمان با دوزهای بالاتر بوسولفان (40 mg/kg) باعث

References

- 1- Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, J.W. Hsueh A. Gonadal cell apoptosis :hormone regulated cell demise. Hum Reprod Update. 1996;2(2):103-17.
- 2- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bio-essay. 2000;22:423-30.
- 3- Ohta H, Aizawa SH, Nishimune Y. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. Biol Reprod. 2003;68:2249-54.
- 4- Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, et al. Enhancement of A Spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by GnRH antagonist administration. Endocrinology. 2000;141:37-49.
- 5- Tohda A, Matsumiya K, Tadokoro Y, Yomogida K, Miyagawa Y, Dohmae K, et al. Testosterone suppresses spermatogenesis in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mice. Biol Reprod. 2001;65:532-7.
- 6- Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, et al. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase 3 and-6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. Endocrinology. 2003;144(2):648-61.
- 7- Roberts R. Apoptosis in toxicology. 2nd Edition. Taylor & Francies, London. 2000;130-204.
- 8- Anderson PhO, Knoblen JE, Troutman WG. Handbook of clinical data. 10th Edition. Mc Graw Hill, New york. 2002;p:136-40.
- 9- Choi YJ, Ok DW, Kwon DN, Chung JI, Kim HC, Yeo SM, et al. Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correleates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL-and P53-independent manner. FEBS Lett. 2004;575(1-3):41-51.
- 10- Van Keulen CJ, de Rooij DG. Spermatogenetic clones developing from repopulating stem cells surviving a high dose of an alkylating agent. Cell Tissue Kinet. 1975;8(6):543-51.
- 11- Bishop JB, Wassom JS. Toxicological review of busulfan (Myleran). Mutat Res. 1986;168(1):15-45.
- 12- Bucci LR, Meistrich ML. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. Mutat Res. 1987;176(2):259-68.
- 13- Janes GF, Pomerantz DK. The effect of prenatal treatment with busulfan on in vitro androgen production by testes from rats of various ages. Can J Physiol Pharmacol. 1985;63(9):1155-58.
- 14- Boujrad N, Hochereau-de Rivers MT, Kamtchouing P, Perreau C, Carreau S. Evolution of somatic and germ cell populations after busulfan treatment in utero or neonatal cryptorchidism in the rat. Andrologia. 1995; 27(4):223-8.

- 15- Grigg AP, McLachlan R, Zaja J, Szer J. Reproductive status in long term bone marrow transplant survivors receiving busulfan- cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(10):1086-95.
- 16- Afify Z, Shaw PJ, Clavano-Harding A, Cowell CT. Growth and endocrine function in children with acute myeloid leukemia after bone marrow transplantation using busulfan/ cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(10):1087-92.
- 17- Veccino P, Uranga J, Arechaga J. Suppression of spermatogenesis for cell transplantation in adult mice. *Protoplasma*. 2001;217(4):191-8.
- 18- Honaramooz A, Behboodi E, Hausler CL, Blash S, Ayres S, et al. Depletion of endogenous germ cells in male pigs and goats in preparation for germ cell transplantation. *J Androl*. 2005;26(6):698-705.
- 19- Boujrad N, Hochereau-de Rivers MT, Kamtchouing P, Perreau C, Carreau S. Evolution of somatic and germ cell populations after busulfan treatment in utero or neonatal cryptorchidism in the rat. *Andrologia*. 1995; 27(4):223-8.
- 20- Howell SJ, Shalet SM. Testicular function following chemotherapy. *Hum Reprod Update*. 2001;7(4):363-9.
- ۲۱- فهیمه محمد قاسمی، جعفر سلیمانی راد، احمد علی قنبری. مطالعه مورفولوژی و مورفومتري بيضه موش بالغ بدنبال تجویز مقادير مختلف بوسولفان. فصلنامه باروری و ناباروری. دوره هفتم شماره اول، بهار ۱۳۸۵. صفحات: ۲۵ تا ۳۶.
- 22- Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Yumura Y, Takeda M, Hosaka M. GnRH analog, leuprorelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *Int J Urol*. 2001;8:615-22.
- 23- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(3): 327-34.
- 24- Sawhney P, Gimmona J, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult c57/BL/6J Mice. *J Androl*. 2005;26(1):136-45.
- 25- Swada H, Esaki M. Electron microscopic observation of 137Cs-irradiated rat testis: Production of basal laminae for germ cells, despite their absence. *J Electron Microsc*. 2003;52(4):391-7.
- 26- Newton SC, Blaschuk OW, Millette CF. N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev Dyn*. 1993;197(1):1-13.
- 27- Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, Putzi M, Powell CT, Lin C, et al. E-cadherin mediates aggregation dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9656-64.
- 28- Allan DJ, Gobe GC, Harmon BV. Sertoli cell death by apoptosis in the immature rat testis following x-irradiation. *Scanning Microsc*. 1998;2(1):503-12.
- 29- Ateeq B, Farah MA, Ahmad W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *clarius batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Science*. 2006;78 (9):977-86.
- 30- Andrew W, Vicki D, Berton F, Hill D, Mansow S. Apoptosis and cell differentiation. 2nd Edition. Boehringer Mannheim. 1998;p:116-20.
- 31- Francavilla S, D'Abrizio P, Cordeschi G, Pelliccione F, Necozone S, Ulisse S, et al. Fas expression correlates with human germ cell degeneration in meiotic and post-meiotic arrest of spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(3):213-20.
- 32- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. 2000; *Bioessays*. 22(5):423-30.
- 33- Shiratsuchi A, Kawasaki Y, Ikemoto M, Arai H, Nakanishi Y. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rats spermatogenic cells by sertoli cells. *J Biol Chem*. 1999;274(9):5901-08.
- 34- Tesarik J, Greco F, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod*. 1998;4 (8):757-62.
- 35- Kopcky M, Semecky V, Nachtigal P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem*. 2005;107(4):279-89.
- 36- Brinkworth MH, Nieschlag E. Association of cyclophosphamide-induced male mediated, foetal abnormalities with reduced paternal germ cell apoptosis. *Mutat Res*. 2000;447:149-54.
- 37- Sawhney P, Gimmona J, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57 /BL/6J mice. *J Androl*. 2005;26(1):136-45.
- 38- Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-Induced germ cell apoptosis in mouse testes. *Arch Androl*. 2001;46(1):43-9.
- 39- Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reproduction*. 1997;56(6): 1490-7.
- 40- Krishnamurthy H, Weinbauer GF, Aslam H, Yeung CH. Quantification of apoptotic testicular germ cells in normal and Methoxyacetic acid-treated mice as determined by flow cytometry. *J Androl*. 1998;19(6): 710-7.
- 41- Udagawa K, Takeda M, Hosaka M, Kubota Y, Ogawa T. Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analoge treatment in rat cryptorchid testis after orchiopexy. *J Urol*. 2002;168 (3):1279-83.